

Partial Translation of JP1992-325080

[0010] Fig. 4 illustrates a schematic view of a device in accordance with another embodiment. Mark 1 shows capillary tubes helically wound. Mark 2 shows an inlet of a reaction mixture, mark 3 represents a gas inlet, mark 4 describes an outlet of a reaction mixture, and mark 6 depicts a three-branched valve.

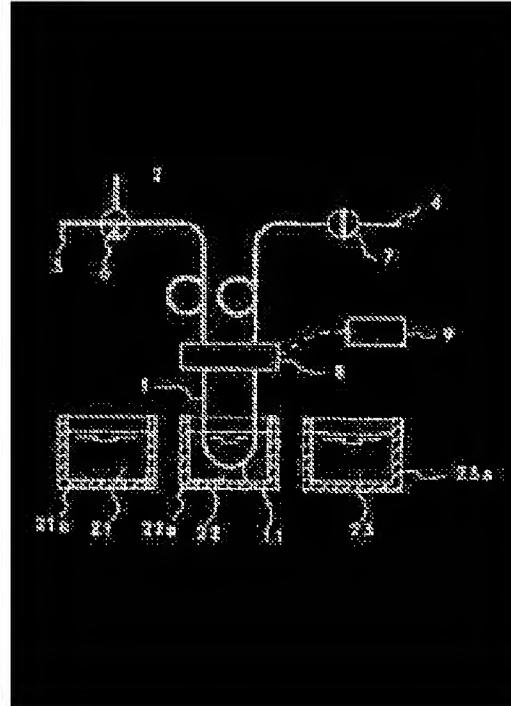
[0011] Marks 31, 32 and 33 illustrates heating blocks, which are maintained at denaturation, annealing and extension temperature, respectively. Capillary tube 1 is helically wound around the heating blocks while being subject to thermal contact with the heating blocks sufficiently. Mark 11 shows a reaction mixture. The number of times that the capillary tube 1 winds around the heating blocks may be over the times required in PCR method where the temperature repetitively varies in the order of denaturation, annealing and extension. Hereinafter, referring to Fig. 4, the specific method is described. The contamination of a reaction mixture is prevented by flowing washing solution into the region where the reaction mixture will pass, e.g., the capillary tube 1 or three-branched valve 6 etc. An inlet of a reaction mixture 2 and capillary tube 1 are interlinked by operating the three-branched valve 6. After the reaction mixture 11 is injected into the capillary tube 1 through the inlet of a reaction mixture 2, the gas inlet 3 and the capillary tube 1 are interlinked by operating the three-branched valve 6, and the gas is injected into the capillary tube 1 for the reaction mixture 11 to be located in a predetermined position of the heating block 31. In a predetermined time, when the reaction mixture 11 reaches its denaturation temperature, the gas is injected through the gas inlet 3 for the reaction mixture 11 to be located in a predetermined position of the heating block 32. In a predetermined time, when the reaction mixture 11 reaches its annealing temperature, the gas is injected through the gas inlet 3 for the reaction mixture 11 to be located in a predetermined position of the heating block 33. The above process is repeated with a predetermined times to perform PCR by changing the temperature of the reaction mixture in the order of denaturation, annealing, and extension. And then, the reaction mixture is discharged from the outlet of a reaction mixture 4 by continuously injecting the gas through the gas inlet 3 with a higher speed than before. If the gas injection speed can be controlled from the gas inlet 3 so that the reaction mixture 11 on the mobile phase can reach a desired temperature, PCR can be performed even in the condition of continuous gas injection.

AMPLIFIER OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID**Publication number:** JP4325080 (A)**Publication date:** 1992-11-13**Inventor(s):** USUI SANPEI; FUJITA MASAHIKO ***Applicant(s):** HITACHI LTD ***Classification:****- international:** C07H21/04; C12M1/00; C12Q1/68; C07H21/00; C12M1/00; C12Q1/68; (IPC1-7): C07H21/04; C12M1/00; C12Q1/68**- European:****Application number:** JP19910095498 19910425**Priority number(s):** JP19910095498 19910425**Also published as:**

JP3120466 (B2)

Abstract of JP 4325080 (A)

PURPOSE: To obtain the title device constituted so as to carry out PCR method in such state as to hold both ends of reaction liquid put into a capillary by air, etc., made operation such as removal of mineral oil and sealing by combustion gas unnecessary and capable of carrying out the PCR method in a short time. **CONSTITUTION:** A capillary 1 is put into a heating medium 21 kept at a temperature for modifying a reaction liquid 11 containing a deoxyribonucleic acid to be amplified and then a reaction liquid feed port 2, the capillary 1 and reaction liquid discharge port 4 communicate with operating three-way valve and stop valve 7. Then the reaction liquid 11 is introduced from the feed port 2 into the capillary 1 and then a gas feed port 3 communicates with the capillary 1 to feed the gas so as to carry the reaction liquid 11 at prescribed position in the capillary 1.; The capillary 1 is put into a heating medium 22 of annealing temperature at a point when the reaction liquid 11 attained heat distortion temperature and then put into the heating medium 23 kept to polymerization temperature at a point when the reaction liquid 11 attained annealing temperature. The above-mentioned operation is repeated to carry out PCR method and then a gas is fed from the gas feed port 3 and the reaction liquid 11 is discharged from the discharge port 4.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-325080

(43)公開日 平成4年(1992)11月13日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 12 M 1/00

A 9050-4B

C 07 H 21/04

// C 12 Q 1/68

A 8114-4B

審査請求 未請求 請求項の数5(全5頁)

(21)出願番号

特願平3-95498

(22)出願日

平成3年(1991)4月25日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 白井 三平

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 藤田 雅彦

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(74)代理人 弁理士 小川 勝男

(54)【発明の名称】 デオキシリボ核酸の増幅装置

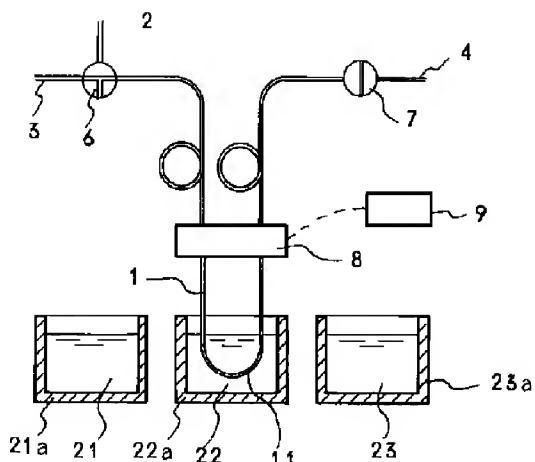
(57)【要約】

【目的】本発明はPCR法を使ったデオキシリボ核酸の増幅装置に関し、特に反応液の容器として毛細管を使用したデオキシリボ核酸の増幅装置に関する。

【構成】毛細管(1)内に前後を空気で挟んだ状態で反応液(11)を入れ毛細管(1)もしくは反応液(11)を移動させて反応液(11)が熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の順に必要回数繰り返すよう構成する。

【効果】鉱物油の除去工程あるいは、毛細管の両端を燃焼ガスで封止する操作、ならびに封止した毛細管から反応液を取り出す操作が不要で短時間で処理できるPCR法が実現できる。また、反応液の供給口、排出口がそれぞれPCR法の前処理工程、後処理工程と連続できるので、継続性のあるデオキシリボ核酸の増幅装置が実現できるという効果もある。

図 1



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】增幅すべきデオキシリボ核酸を含む反応液を収容した細管、前記細管内に前記反応液を送りこむための装置、前記細管部分を所定の温度に制御するための装置よりなり、前記細管内の反応液はこの反応液を送りこむための流体で細管内の所定の位置に封止され且つ所定の位置に移送されることを特徴とするデオキシリボ核酸の增幅装置。

【請求項2】增幅すべきデオキシリボ核酸、前記デオキシリボ核酸の一部と相補的なDNAプライマ、アデニン、チミン、グアニン、シトシンのデオキシリボヌクレオチド、DNAポリメラーゼなどを混合した反応液を空気もしくは他のガスで両端を挟みこんだ状態で細管の中に入れ、二本鎖デオキシリボ核酸を一本鎖デオキシリボ核酸に分離させるための熱変性温度を実現する手段と、前記一本鎖デオキシリボ核酸とDNAプライマとを結合させるアニーリング温度を実現する手段と、DNAポリメラーゼの作用により一本鎖デオキシリボ核酸と結合したDNAプライマに一本鎖デオキシリボ核酸と相補的なデオキシリボヌクレオチドを重合させる重合温度を実現する手段との順で、繰返し所定回数だけ温度変化させることによりデオキシリボ核酸を増幅させるPCR法を自動化したことを特徴とするデオキシリボ核酸の増幅装置。

【請求項3】細管の管路方向に熱変性温度と、アニーリング温度と、重合温度との各温度条件を作る手段を設けるとともに、細管の一方から空気もしくは他のガスを供給もしくは除去することにより細管内の反応液を前記各温度条件の位置に移動させ、反応液を繰返し所定の回数だけ熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の順に温度変化させてPCR法を行わせることを特徴とする請求項2記載のデオキシリボ核酸の増幅装置。

【請求項4】細管を螺旋状に必要な回数だけ巻くとともに、前記した螺旋状の細管の周方向に熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の各温度条件を作る手段を所定の順に配置するとともに、細管の一方から空気もしくは他のガスを間歇的もしくは連続的に所定の速度で供給することにより細管内の反応液を一方向に移動させ、反応液を熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の順に温度変化させてPCR法を行わせ且つこれを所定の回数だけ繰返すことを特徴とする請求項2記載のデオキシリボ核酸の増幅装置。

【請求項5】前記繰返しは、反応液の温度変化が前記した熱変性温度、アニーリング温度、重合温度に達しないように細管内の反応液の移動が高速となるように細管の一方から空気もしくは他のガスを供給することにより、反応液が最初の位置に戻るように制御することを特徴とする請求項4記載のデオキシリボ核酸の増幅装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はPCR法を使ったデオキシリボ核酸の増幅装置に関する特許である。

2

シリボ核酸の増幅装置に関し、特に反応液の容器として毛細管等の細管を使用したデオキシリボ核酸の増幅装置に関する。

【0002】

【従来の技術】PCR法を使ったデオキシリボ核酸の増幅装置の従来技術として、特開昭62-240862号が開示されている。また、反応液の容器として毛細管を使用する方法がアナリティカル・バイオケミストリ、186(1990)第328頁から331頁(Analytical Biochemistry 186(1990) pp 328-331)に記載されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記特開昭62-240862号が開示している従来技術は反応液の容器として使い捨ての蓋付のプラスチック容器(例えば、0.5mlのマイクロヒュージチューブ)の使用を想定し、およそ0.1ml程度の反応液を前記した使い捨ての蓋付のプラスチック容器に入れ、さらに反応液の上層に反応液中の水分の蒸発を防止するための鉱物油を重畳し、およそ95℃程度の熱変性温度、およそ55℃程度のアニーリング温度、およそ70℃程度の重合温度の順に、通常数十回繰返し温度変化させてPCR法を行わせ、デオキシリボ核酸の増幅を行っているが、増幅反応終了後、鉱物油の除去工程が必要となる欠点がある。また、使い捨ての蓋付のプラスチック容器は、熱容量も大きく、反応液への熱伝達も悪いため、PCR法を行う時間が長くなる欠点がある。一方、上記アナリティカル・バイオケミストリ、186(1990)第328頁から331頁が開示している従来技術は反応液の容器として毛細管を使用し、反応液を毛細管の中に入れた後、毛細管の両端を燃焼ガスで封止することにより、反応液中の水分の蒸発を防止するとともに、容器の熱容量を小さくし、かつ反応液への熱伝達を良くしてPCR法を行う時間を短くしているが、毛細管の両端を燃焼ガスで封止する操作、増幅反応終了後、封止した毛細管から反応液を取り出す操作が必要となる欠点がある。また、PCR法を用いたDNAの増幅は、遺伝子解析や遺伝子診断等の工程であり、その前後には目的DNAの抽出、シーケンス反応等の工程があるので、それら前後の工程との継続性が重要であるにもかかわらず、従来技術では前後の工程との継続性に対する考慮がなされていない。

【0004】本発明の目的は、前記従来技術の欠点に鑑みてなしたもので、鉱物油の除去工程を不要とし、PCR法を行う時間を短くし、毛細管の両端を燃焼ガスで封止する操作、ならびに封止した毛細管から反応液を取り出す操作を不要とするとともに、PCR法を用いたDNAの増幅工程の前後の工程との継続性にも考慮した、デオキシリボ核酸の増幅装置を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記目的は、反応液の気

液界面からの水分蒸発が細管内の反応液を流体で封止することで実質的に防止できることに着目して、反応液を毛細管等の細管の中に入れ、前記した反応液を空気もしくは他のガスで両端を挟みこんだ状態にしてPCR法を行わせることにより達成される。

【0006】

【作用】PCR法を行うために反応液は、およそ95℃程度の熱変性温度、およそ55℃程度のアニーリング温度、およそ70℃程度の重合温度の順に、通常数十回繰返し温度変化させられ、その際、水分蒸発が起きると反応液の組成が変化しPCR法が目的どおりに行えない。しかしながら、反応液からの水分蒸発は反応液と流体との界面で起きるので、前記界面の面積を十分小さくすれば水分蒸発を十分小さくでき、PCR法を行う場合に支障を生じない程度の反応液の組成変化にことができる。更に前記流体で反応液の移送を制御できるから、PCR法を用いたDNAの增幅工程の前後の工程との継続性にも考慮した、デオキシリボ核酸の増幅装置が容易に実現できる。

【0007】

【実施例】図1は一実施例を示す構成図で、1は内径が約1mmの毛細管、2は反応液供給口、3はガス給気口、4は反応液排出口、6は三方弁、7は止め弁である。8は毛細管支持具、9は毛細管移動機構であり、これにより毛細管支持具8の位置を制御する。両者の詳細は省略するが、要是スムーズに移動が制御できれば任意の構成が取り得る。21a、22a、23aは、それぞれ容器である。21、22、23は熱媒体で、それぞれ容器21a、22a、23aに入っている。それぞれの熱媒体は、反応液の変性温度、アニーリング温度、重合温度に維持されている。11は反応液であり、毛細管内にガスにより封止されている状態である。以下、図1に従って動作を説明する。予め毛細管1内や三方弁6止め弁7などの反応液の通過する部分を反応液の代わりに洗浄液を流すことにより反応液の汚染を防止し、毛細管移動機構9により毛細管支持具8によって毛細管1を熱媒体21の中に入れたのち、三方弁6、止め弁7を操作し、それぞれ反応液供給口2と毛細管1、毛細管1と反応液排出口4とを連通させる。反応液11を反応液供給口2より毛細管1の中に入れたのち、三方弁6を操作しガス給気口3と毛細管1とを連通させ、反応液11が毛細管1内の所定の位置に来るようガス給気口3よりガスを供給する。所定の時間後反応液11が熱変性温度になったら、毛細管支持具8に連結された毛細管移動機構9を動作させて毛細管1を熱媒体22の中に入れる。所定の時間後反応液11が重合温度になったら、毛細管支持具8に連結された毛細管移動機構9を動作させて毛細管1を熱媒体23の中に入れる。所定の時間後反応液11が

の中に入れる。以下、毛細管1の移動をおなじ順序で繰り返し所定の回数だけ熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の順に反応液を温度変化させてPCR法を実施したのち、ガス給気口3よりガスを供給して反応液11を反応液排出口4より排出する。以上の動作のなかで、三方弁6を操作しガス給気口3と毛細管1とを連通させ、反応液11が毛細管1内の所定の位置に来るようガス給気口3よりガスを供給する際に、止め弁7を操作し毛細管1内に適当な内圧がかかるようにしてもよい。このようにすると仮りに反応液11中に微量の空気等のガスが混入していても反応液の温度変化によるガスの膨張に伴う反応液の分断を防止できる効果がある。

【0008】いま一例として、内径1mm、外径2mmのプラスチック製の毛細管を用い、反応液を毛細管に入れた状態で95℃の熱変性温度から55℃のアニーリング温度の温水中に毛細管を入れたときの反応液の温度変化を数値計算で求め、反応液の平均温度の時間変化としてしめすと図2のようになる。この図から反応液の温度が約15秒で95℃の熱変性温度からほぼ55℃のアニーリング温度になることが分かる。即ち、毛細管の移動時間を入れても熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の一連の温度変化に要する時間は約1分程度でありそれを30回程度繰り返しても約30分でPCR法を実施できる。計算結果は示さないが、内外径をそれぞれ1/2にすれば約15分でPCR法を実施できる。

【0009】図3は他の実施例を示す構成図で、1は毛細管、2は反応液供給口、3、5はガス給排気口、4は反応液排出口、61、62は三方弁、21、22、23は熱媒体、21a、22a、23aは容器で、これに入っている熱媒体はそれぞれ熱変性温度、アニーリング温度、重合温度に維持されている。11は反応液である。図3の実施例は、図1のそれに比し毛細管1の移動に代え反応液11自体を移動させることとしたものである。以下、図3に従って動作を説明する。予め毛細管1内や三方弁61、62などの反応液の通過する部分を反応液の代わりに洗浄液を流すことにより反応液の汚染を防止したのち、三方弁61、62を操作し、それぞれ反応液供給口2と毛細管1、毛細管1とガス給排気口5とを連通させる。反応液11を反応液供給口2より毛細管1の中に入れたのち、三方弁61を操作しガス給排気口3と毛細管1とを連通させ、反応液11が熱媒体21に浸っている毛細管1内の所定の位置に来るようガス給排気口3よりガスを供給する。所定の時間後反応液11が熱変性温度になったら、反応液11が熱媒体22に浸っている毛細管1内の所定の位置に来るようガス給排気口3よりガスを供給する。所定の時間後反応液11がアニーリング温度になったら、反応液11が熱媒体23に浸っている毛細管1内の所定の位置に来るようガス給排気口3よりガスを供給する。所定の時間後反応液11が重合温度になったら、反応液11が熱媒体21に浸って

いる毛細管1内の所定の位置に来るようガス給排気口5よりガスを供給する。以下、反応液1の毛細管1内の移動を繰り返し所定の回数だけ熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の順に反応液を温度変化させてPCR法を実施したのち、三方弁6を操作し毛細管1と反応液排出口4とを連通させ、ガス給排気口3よりガスを供給して反応液1を反応液排出口4より排出する。勿論、反応液を繰り返しのために逆送するときは短時間で戻るように制御することとして、この逆送による影響の無いようにすることはいうまでもない。また、ガス給排気口3、5よりガスを供給して反応液1の毛細管1内の移動を繰り返す場合に毛細管1内に適当な内圧がかかるようにしてもよい。この効果は第1の実施例と同様である。本実施例で、第1の実施例と同一の寸法の毛細管を使用した場合、毛細管は既に目的の温度になつてるので反応液の温度が目的の温度になるのに要する時間は第1の実施例より短いことが容易に類推される。また、本発明では、反応液の移動がガスの給排気によりおこなわれるため、可動部がほとんどなく、安価で信頼性の高い装置とすることができる効果がある。

【0010】図4は更に他の実施例を示す構成図で、1は毛細管で螺旋状に巻かれている。2は反応液供給口、3はガス給気口、4は反応液排出口、6は三方弁である。

【0011】31、32、33はヒートブロックでそれぞれ熱変性温度、アニーリング温度、重合温度に維持されており、毛細管1は、これに熱的に十分接触した状態で螺旋状に巻かれている。11は反応液である。毛細管1の螺旋巻数は熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の順に温度変化を繰り返すPCR法の必要な回数以上にする。以下、図4に従って動作を説明する。予め毛細管1内や三方弁6などの反応液の通過する部分を反応液の代わりに洗浄液を流すことにより反応液の汚染を防止し、三方弁6を操作し、反応液供給口2と毛細管1とを連通させる。反応液1を反応液供給口2より毛細管1の中に入れたのち、三方弁6を操作しガス給気口3と毛細管1とを連通させ、反応液1がヒートブロック31の所定の位置に来るようガス給気口3よりガスを供給する。所定の時間後反応液1が熱変性温度になったら、反応液1がヒートブロック32の所定の位置に来るようガス給気口3よりガスを供給する。所定の時間後反応液1がアニーリング温度になったら、反応液1がヒートブロック33の所定の位置に来るようガス給気口3よりガスを供給する。以下、同様の操作を繰り返し所定の回数だけ熱変性温度、アニーリング温度、重合温度の順に反応液を温度変化させてPCR法を実施したのち、ガス給気口3よりガスの供給速度を前記した速度より速くして連続供給し、反応液1を反応液排出口4より排出する。前記した動作のなかで反応液1が移動中に目的の温度になるように給気口3からのガス供給

速度を適当に制御すれば、ガスの供給を連続的におこなつてもPCR法を実施できる。なお、反応液排出口4の前後の適当な位置に絞り等の流体抵抗素子を設け毛細管1内に適当な内圧がかかるようにしてもよい。この効果は第1の実施例と同様である。本実施例で、第1の実施例と同一の寸法の毛細管を使用した場合、毛細管は既に目的の温度になつてるので反応液の温度が目的の温度になるのに要する時間は第1の実施例より短いことが容易に類推される。また、本実施例では、反応液が一方向に移動することによりPCR法が行われるためガスの給気制御が容易であるとともに、反応液を不適切な温度状態にある場所を逆送する必要が無いから制御を高精度にできる。更に可動部がほとんどなく、安価で信頼性の高い装置とすることができる効果がある。

【0012】反応液の界面での蒸発量について概算してみると次のようである。

【0013】前記の蓋付のプラスチック容器に反応液を入れたときの界面の面積はおよそ35mm²、一方、内径1mmの毛細管では両端合わせて約1.6mm²であるから界面の面積は1/20以下になる。必要に応じてさらに細い内径の毛細管の使用すれば、界面の面積をさらに小さくすることも容易である。界面の面積を小さくすれば、水分蒸発を十分小さくできることは以下の事実でも証明される。内径1mmのプラスチック製の毛細管を用い、前記毛細管の中に反応液を入れ、前記した反応液を空気で両端を挿みこんだ状態にして95℃の恒温室に10分入れておいても、水分蒸発量は0.1%程度であった。温度が低ければ水分蒸発量がさらに小さくなることは自明である。すなわち、内径1mm程度以下の毛細管を反応液の容器として用い、前記毛細管の中に反応液を入れ、前記した反応液を空気もしくは他のガスで両端を挿みこんだ状態にすれば、従来技術で使用している鉱物油を使用しなくてよく、また、アカリティカル・バイオケミストリ、186(1990)第328頁から331頁(Analytical Biochemistry 186(1990) pp328-331)に提示されているように毛細管の前後を封止しなくてもPCR法を行う場合に支障を生じない程度の反応液の組成変化で目的とするPCR法が行える。

【0014】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば、前記従来技術の欠点である、鉱物油の除去工程あるいは、毛細管の両端を燃焼ガスで封止する操作、ならびに封止した毛細管から反応液を取り出す操作が不要で、かつ、短時間で処理できるPCR法が実現できるだけでなく、反応液の供給、排出がそれぞれPCR法の前処理工程、後処理工程と連続できるよう工夫されているので、PCR法を用いたDNAの増幅工程の前後の工程との継続性のあるデオキシリボ核酸の増幅装置が実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例を示す構成図である。

7

【図2】反応液の平均温度変化の一例を示す図である。

【図3】本発明の他の実施例を示す構成図である。

【図4】本発明の他の実施例を示す構成図である。

【符号の説明】

1…毛細管、2…反応液供給口、3…ガス給気口、4…

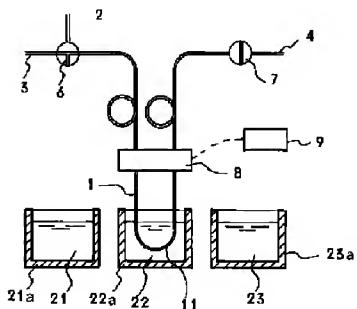
反応液排出口、5…ガス給排気口、6、61、62…三

方弁、7は止め弁、21、22、23…熱媒体、31、

32, 33…ヒートブロック

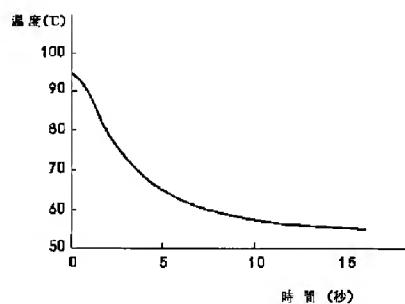
【図1】

1



【図3】

3



【図4】

图 4

